

Определување селен во помошни лековити средства со примена на AAS

Руменка Петковска^{1*}, Билјана Маневска², Лидија Петрушевска-Този¹,
Анета Димитровска¹

¹Фармацевтски факултет, Универзитет "Кирил и Методиј", Скопје, Р. Македонија

²ЈЗО - Републички Завод за здравствена заштита, Скопје, Р. Македонија

Received March 2003; accepted August 2003

Апстракт

Определувањето селен во помошни лековити средства беше извршено со атомска апсорпциона спектрометрија со примена на графитна печка и хидриден систем.

Подготовката на примероците беше направена со микробраново разорување. За графитна техника е користена смеса од модификатори што содржи раствори на $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ со масена концентрација 1,5 g/l и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ со масена концентрација 1g/l во раствор на HNO_3 со концентрација 2,3 mol/l. За хидридниот систем користен е раствор на NaBH_4 со масен удел 1,5% во раствор од NaOH со масен удел 0,5%. Методот беше валидиран преку определување: линеарност (во концентрационо подрачје од 15 до 75 $\mu\text{g/l}$ за графитна техника и 5 до 25 $\mu\text{g/l}$ за хидриден систем), точност, прецизност, лимит на детекција (4 $\mu\text{g/l}$ за графитна техника и 1 $\mu\text{g/l}$ за хидриден систем) и квантификација (13 $\mu\text{g/l}$ за графитна техника и 3 $\mu\text{g/l}$ за хидриден систем). Методот беше применет за определување селен во три препарати во кои селенот е во комбинација со: цинк, бакар и витамините А, С и Е. Добиените резултати покажуваат дека предложените методи за определување селен во фармацевтски препарати се осетливи, прецизни, точни и репродукбилни.

Клучни зборови: селен, електротермичка атомска апсорпциона спектрометрија, атомска апсорпциона спектрометрија со хидриден систем

Вовед

Интензивните оксидативни процеси во организмот доведуваат до појава на т.н. оксидативен стрес кој е последица на оксидативни оштетувања на ткивата и појава на нивна патофизиолошка функција. Човековиот организам поседува т.н. антиоксидативен одбранбен систем за неутрализација на слободните кислородни радикали и спречување на оштетувањата што тие може да ги предизвикаат. Важен дел во тој систем зазема селенот. Намалувањето на капацитетот и функцијата на антиоксидативниот систем доведува до забрзано стареење на организмот, намалување на природниот имунитет и појава на голем број заболувања, вклучувајќи ја и карциногенезата (1, 2).

Селенот претставува есенцијален олигоелемент. Најголем дел од дневните потреби кои за возрастни изнесуваат 50-200 μg се задоволуваат преку исхраната. Имајќи го предвид антиоксидативното дејствување како и улогата во превенцијата на дегенеративни и малигни заболувања, се почеста е примената на селенот во облик на препарати што се користат како додатоци во исхраната или како помошни лековити средства (3, 4).

Според литературните податоци, квантитативното определување на селен може да се врши со примена на атомската апсорпциона спектрометрија, (5-9), со примена на спектрофотометриски метод (10-12), со високоефикасна течна хроматографија (13-15) или со примена на капиларна електрофореза (16, 17).

За примена на спектрофотометрискиот метод, високоефективната течна хроматографија и капиларната електрофореза неопходно е комплексирање на селенот со соодветни комплексирачки органични молекули: 2,3-диаминонафтален, 3,3-диаминобензидин, 1,2-диамин-4-нитробензен и др. (10-17).

Целта на овој труд е развивање метод за квантитативно определување на селен во дозирани фармацевтски форми, таблети и капсули, што спаѓаат во групата на помошни лековити средства со атомска апсорпциона спектрометрија (AAS) со примена на графитна техника (ETAAS) и со хидриден систем (HGS).

Експериментален дел

Испитувани примероци

Определувањето на селен е вршено во дозирани фармацевтски форми што претставуваат комбинација селен со витамините А, С и Е, и тоа: капсули со содржина на селен (комплекс со квасец) од 50 и 100 μg /капсула и во ефервесцентни таблети што се комбинација на витамини и на олигоелементи со содржина на селен од 25 μg /таблета.

Електрохемиска апсорпциона спектрометрија (ETAAS)

Апаратура: Користен е Perkin Elmer AAS 4100 систем опремен со графитна печка HGA 700, ауто-семплер AS - 70, EDL Se -ламба и континуиран дутериумов коректор на зрачењето на фонот. AAS системот е контролиран преку софтверска програма AAWin Lab.

Работни услови:

бранова должина:	196 nm
отвор на процепот:	2,0 nm
јачина на струја во ламбата:	310 mA
температура на предатомизација:	1100 °C
температура на атомизација:	2100 °C
волумен на инјектирање:	20 μl (стандард, анализа)
	10 μl модификатор

Подготовка на стандардни раствори: За подготовка на стандардните раствори користен е стандарден раствор на селен, 1000 mg/l-Merck и 5% HNO_3 -Merck- trace pure.

За конструирање на калибрациониот дијаграм за определување селен користена е серија од работни стандардни раствори на селен со концентрација од

15-75 $\mu\text{g/l}$, а за утврдување на лимитот на детекција и квантификација серија од работни стандардни раствори со концентрација од 4-12 $\mu\text{g/l}$. Работните стандардни раствори се приготвени со додавање HNO_3 така што нејзината концентрација да изнесува 2,3 mol/l.

Подготовка на примероци: Минерализацијата на примероците е вршена во микробранова печка PAAR – PHYSICA. Определена маса од испитуваниот примерок што одговара на едно просечно полнење (капсули), односно една просечна маса (таблети) е минерализирана со додаток на 2,0 ml 30% H_2O_2 -Merck-trace pure и 4,0 ml 65% HNO_3 -Merck-trace pure. Со разредување на минерализираниот примерок подготвени се работни пробни раствори во 2,3 mol/l HNO_3 со концентрација 50 $\mu\text{g/l}$.

Како слепа проба користен е раствор на HNO_3 со концентрација 2,3 mol/l.

Смесата на модификатори содржи $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ со масена концентрација од 1,5g/l и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ со масена концентрација 1g/l во раствор на HNO_3 со концентрација 2,3 mol/l. За подготовка на смесата користен е раствор на $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ со масена концентрација 10g/l, Merck- trace pure и раствор на $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ со масена концентрација 10g/l, Merck- trace pure.

Метод на стандардни додатоци: Пробите користени за методот на стандардни додатоци се добиени со додавање стандарден раствор на селен во испитуваните препарати пред минерализација во количества од 40%, 60% и 100% од декларираната маса на Se (25 μg Se/таблета); 30%, 60% и 100% од декларираната маса на Se (50 μg Se/капсула) и 25%, 50% и 75% од декларираната маса на Se (100 μg Se/таблета).

Хидриден систем (HGS)

Апаратура: Користен е Perkin Elmer AAS 372 систем опремен со MHS - 10 и EDL ламба.

Работни услови

бранова должина:	196 nm
отвор на процепот:	2,0 nm
смеса на гасови:	ацетилен/воздух
интеграционо време:	15 секунди
волумен на инјектирање:	10 ml

Подготовка на стандардни раствори: За подготовка на стандардните раствори користен е стандарден раствор на селен (1000 mg/l Merck).

За калибрациониот дијаграм на селен користена е серија од работни стандардни раствори на селен со концентрација од 5-25 $\mu\text{g/l}$, а за утврдување на лимитот на детекција и квантификација серија од работни стандардни раствори со концентрација од 0,5-4,5 $\mu\text{g/l}$. Работните стандардни раствори се приготвени со деминерализирана вода.

Метод на стандардни додатоци: Растворите користени за методот на стандардни додатоци се приготвени на ист начин опишан во делот за графитна техника.

Подготовка на примероциџе: Минерализацијата на примероците е вршена на ист начин опишан во делот за ETAAS. Со разредување на минерализираниот примерок со деминерализирана вода изработени се работни пробни раствори со концентрација од 15 $\mu\text{g/l}$.

Приготвените работни раствори пред воведување во уредот за генерирање на хидрид се закиселуваат со 37 % HCl, така што нејзината концентрација изнесува 1,2 mol/l.

За слепа проба користен е раствор на HCl со концентрација 1,2 mol/l.

Раствор на натриум тетрахидроборат: раствор на NaBH_4 со масен удел 1,5% и на NaOH со масен удел 0,5%. За негова подготовка користени се NaOH (Merck trace pure), NaBH_4 (Merck trace pure).

Резултати и дискусија

Определување селен со електроџермичка аџиомска аџсорџиона сџекџромеџрија (ETAAS)

Примената на електротермичката апсорџиона спектрометрија за квантитативно определување на селен е лимитирана од физичките својства на овој елемент. Тоа, пред си се однесува на ниската температура на вриење на Se и неговите соединенија. Поради тоа е неопходна примена на модификатори на матриксот што го преведуваат селенот во селенид (18).

Изборот на модификаторот претставува еден од најзначајните моменти за квантитативна атомизација на испитуваниот елемент. Според литературните податоци за определување селен, како модификатори се користат $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, поединечно или во смеса (18-20). Во нашиот труд е користена смеса од $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ во раствор на HNO_3 со концентрација 2,3 mol/l, со масена концентрација 1,5 g/l $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ со

масена концентрација 1g/l. Смесата на модификатори обезбедува целосно преведување на селенот во соодветни селениди. Тоа овозможува примена на температура на предатомизација од 1100 $^\circ\text{C}$, наместо 350 $^\circ\text{C}$ која вообичаено се користи за селен, без да настанат губитоци заради испарување (19).

Во еден од испитуваните примероци, од олигоелементите, покрај селен се присутни и цинк и бакар. Брановата должина на максимална апсорџија на бакарот е 324,8 nm, а на цинкот 213,9 nm. Високата температура на предатомизација на селенот овозможува елиминација на цинкот во оваа фаза, бидејќи неговата температура на предатомизација е 700 $^\circ\text{C}$. Со тоа се отстрануваат можните интерференции од страна на цинкот во фазата на атомизација. Температурата на предатомизација на бакарот е блиска со онаа на селенот (1300 $^\circ\text{C}$), меѓутоа постои значителна разлика во брановата должина на максимумот на апсорџија (21).

Селенидите на паладиум и магнезиум се нерастворливи во вода, а се добро растворливи во киселина. Како растворувач најчесто се користи HNO_3 (18-20). Нашето експериментално искуство покажа дека примената на 2,3 mol/l HNO_3 како медиум за растворање на минерализираниот примерок овозможува комплетно растворање на селенидите.

ААС определување селен со аџиомизација со хидриден систем

ААС методот со примена на хидриден систем се базира на својството на селенот во оксидационен број +4 во кисела средина и присуство на NaBH_4 да гради лесно испарливи хидриди. Хидридите образувани од селен во оксидационен број +6 даваат речиси немерливи сигнали. Поради тоа хлороводородната киселина присутна во растворот има двојна функција: овозможува редукција на Se(IV) и обезбедува кисел медиум за одвивање на хемиската реакција (21). При нашата работа користен е медиум на HCl со концентрација од 1,2 mol/l.

Концентрацијата на растворот на NaBH_4 е втор значаен момент. Според литературните податоци, концентрацијата варира зависно од очекуваната концентрација на Se^{4+} во растворот (18, 19, 21). Од извршените испитувања беше утврдено дека раствор на NaBH_4 со масен удел 1,5% во раствор од NaOH со масен удел 0,5%, проток од 10 ml/минута и интеграционо време од 15 секунди обезбедува квантитативно преведување на селенот од испитуваниот раствор во селен хидрид.

Предложените методи за определување на селен со ETAAS и AAS со систем за хидридно генерирање се валидирани преку испитување на линеарност (Табела 1), лимит на детекција и квантификација (Табела 2), точност и прецизност.

Табела 1. Параметри на калибрационите дијаграми за утврдување линеарност на методите со ETAAS и AAS со хидриден систем

	ETAAS	HGS
конц. област ($\mu\text{g/l}$)	15 – 75	5 – 25
a*	0,0093	0,0132
b*	0,0039	0,0354
SD*(a)	$\pm 3,4 \times 10^{-3}$	$\pm 6,4 \times 10^{-3}$
SD*(b)	$\pm 8,9 \times 10^{-4}$	$\pm 1,9 \times 10^{-3}$
r^2 *	0,9998	0,9998

a–пресек, b–наклон на регресиона права, SD–стандардна девијација, r–коэффициент на корелација

Табела 2. Параметри на калибрационите дијаграми за утврдување лимит на детекција и лимит на квантификација на методите со ETAAS и AAS со хидриден систем

	ETAAS	HGS
конц. област ($\mu\text{g/l}$)	4 - 12	0,5 - 4,5
a*	0,0003	0,0013
b*	0,0046	0,0377
SD*(a)	$\pm 4,8 \times 10^{-3}$	$\pm 5,4 \times 10^{-3}$
SD*(b)	$\pm 7,3 \times 10^{-4}$	$\pm 6,0 \times 10^{-2}$
r^2 *	0,9996	0,9996

*a - пресек, *b - наклон на регресиона права, SD* - стандардна девијација, r* - коэффициент на корелација

Лимитот на детекција и квантификација на селен беа определени со анализа на калибрационите дијаграми во подрачјето на апроксимативниот квантификационен и детекционен лимит.

Лимитот на детекција и лимитот на квантификација за селен со примена на ETAAS изнесува:

$$LD = 3,3 \times SD/b$$

$$LK = 10 \times SD/b$$

$$LD = 3,3 \times 0,005238/0,003942 = 4,38 \mu\text{g/l} \approx 4,0 \mu\text{g/l}$$

$$LK = 10 \times 0,005238/0,003942 = 13,28 \mu\text{g/l} \approx 13,0 \mu\text{g/l}$$

Лимитот на детекција и лимитот на квантификација за селен со примена на AAS со хидриден систем изнесува:

$$LD = 3,3 \times SD/b$$

$$LK = 10 \times SD/b$$

$$LD = 3,3 \times 0,0130/0,0377 = 1,13 \mu\text{g/l} \approx 1,0 \mu\text{g/l}$$

$$LK = 10 \times 0,0130/0,0377 = 3,44 \mu\text{g/l} \approx 3,0 \mu\text{g/l}$$

(SD– стандардна девијација на слепа проба, b - наклон на регресиона права)

Точноста и прецизноста на двата метода (ETAAS и AAS со систем за хидридно генерирање) се утврдени преку определување на содржината на селен во испитуваните препарати (Табела 3), а се потврдени со методот на стандардни додатоци (Табела 4).

Добиените вредности за релативната стандардна девијација, 0,96-3,40% за ETAAS и 1,06-3,85% за AAS со хидриден систем и вредностите за аналитички принос, 100,32-102,8% за ETAAS и 99,42-102,38% за AAS со хидриден систем, укажуваат дека примената на двете техники овозможува висок степен на прецизност, репродукцибилност и точност на резултатите добиени од определувањето селен во фармацевтските препарати. Вредноста на t-коэффициентот добиена со “STUDENT t-test” покажува дека не постои статистички значајна разлика меѓу резултатите добиени со примена на двете техники.

Точноста на методот со примена на двете техники беше потврдена со методот на стандардни додатоци.

Добиените вредности за аналитички принос од методот на стандардни додатоци, 98,93-102,32% за ETAAS и 98,94-102,10% за AAS со хидриден систем го потврдува фактот дека методите со примена на ETAAS и со примена на AAS со хидриден систем се квантитативни и точни.

Табела 3. Статистичка процена на добиените резултати при определувањето на содржината на селен во фармацевтски препарати со примена на ETAAS и хидриден систем (HGS)

Фармацевтски облик	Метод	0 ($\mu\text{g}/\text{дозирана единица}$)	Аналитички принос (%)	RSD (%)	t
Таблети	ETAAS	24,45	92,72-100,12	3,40	
25 μg Se	HGS	24,29	92,08-100,52	3,85	0,2857
Капсули	ETAAS	50,13	98,26-100,86	1,31	
50 μg Se	HGS	50,19	97,06-103,96	2,80	0,0862
Таблети	ETAAS	101,43	100,32-102,08	0,96	
100 μg Se	HGS	101,54	99,42-102,38	1,06	0,1691

Табела 4. Резултати од методот на стандардни додатоци (n=6)

Метод	Декларирано (µg/дозирана единица)	Пресметано (µg/дозирана единица)	Определено (µg/дозирана единица)	Аналитички принос (%)	
ETAAS	25	-	23,99	-	
		33,99	33,87	99,67	
		38,99	39,31	100,84	
	50	48,99	44,89	99,78	
		-	49,86	-	
		64,86	64,69	99,75	
	100	79,86	80,93	101,35	
		99,86	98,79	98,93	
		-	101,88	-	
	HGS	25	126,88	129,30	101,91
			151,88	155,40	102,32
			176,88	179,09	101,25
50		-	23,80	-	
		33,80	33,73	99,82	
		38,80	39,32	101,35	
100		48,80	48,28	98,94	
		-	48,95	-	
		63,95	64,68	101,15	
50		78,95	78,57	99,53	
		98,95	99,75	100,81	
		-	101,15	-	
100	126,15	128,28	101,69		
	151,15	154,32	102,10		
	176,15	177,75	100,91		

Заклучок

Предложените методи за определување селен со електротермичка AAS и AAS со систем за хидридно генерирање се брзи, едноставни, точни и репродуцибилни и можат да се применат за рутински анализи при определувањето селен во дозиран фармацевтски препарат.

AAS методот со примена на атомизација со хидриден систем е специфичен за определена група хемиски елементи (As, Se, Bi, Sb, Sn, и Te) од кои единствено селенот се среќава како активна компонента во голем број помошни лековити средства. Методот се карактеризира и со поголема осетливост. Тоа дава можност да му се даде предност на овој метод во однос на графитната техника за квантитативно определување селен во помошни лековити средства во кои е присутен во ниски дози и во комбинација со други олигоелементи.

Литература

- O. Lozanov-Stankov, M. Demajo, I. Djunic and M. Mandic, *J. Environ. Path., Toxic. Oncol.*, **17**, 251-157 (1998).
- H. D. Holben and A. M. Smith, *J. Am. Diet. Ass.*, **7**, 836-843 (1999).
- S. J. Fairweather-Tait, *European J. Clin. Nutr.*, **51**, S20-S23 (1997).
- L. A. Daniels, *Biol. Trace Elem. Res.*, **54**, 185-199 (1996).
- A. Lozak and Z. Fijalek, *Chem. Anal.*, (Warsaw), **43** (1), 1-7 (1998).
- A. Lozak and Z. Fijalek, *Chem. Anal.*, (Warsaw), **43** (6), 1003-1010 (1998).
- A. Lozak and Z. Fijalek, *Acta Pol. Pharm. – Drug Research*, **53** (2), 83 – 85 (1996).
- J. Isegava, K. Yamamoto, K. Terashima and M. Sato, *Biomed. Res. trace Elements*, **3** (2), 225 – 226 (1992).
- G. Rotaru and D. Napredean, *Farmacia* (Bucharest), **44** (7-8), 71-75 (1996).
- J. Stachowiak, *Rocz. Akad. Roln. Poznaniu*, **281**, 43-47 (1995).
- W. Wanzheng, *Biomed. Res. Trace Elements*, **2** (7), 65-67 (1995).
- K. N. Ramachandran and G. S. Kumar, *Talanta*, **43** (10), 1711-1714 (1996).
- Li Huizhi and Z. Xinwei, *Yejin Fenxi*, **12** (4), 18-21 (1992).
- K. Gottfried, K. Kurt and I. Kurt, *Appl. Organomet. Chem.*, **7** (7), 443 – 466 (1993).
- L. Yuanying, B. Zhiyi, L. Junbun and L. Wenyuan, *Fenxi Ceshi Tangbao*, **11** (6), 54-7 (1992).

16. A. Colon Luis and B. Eugene, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **14** (9), 608-612 (1991).
17. S. Sri Juari, S. Noriyuki and T. Shigeru, *Anal. Sci.*, **9** (5), 657-62 (1993).
18. W. Andrea, B. Phyllis, J. Petr, J. R. William and H. L. Allan, *J. Chromatogr.*, **593** (1-2), 289-295 (1992).
19. B. Welz, *Atomic Absorption Spectrometry*, 2th ed, Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1985, p.p. 148-163
20. D. A. Skoog and J. J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Edition, Saunders College Publishing, 1992, p.p. 211-223
21. R. D. Beaty and J. D. Kerber, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA, 1993.

Summary

AAS method for determination of selenium in therapeutical nutritions

Rumenka Petkovska^{1*}, Biljana Manevska², Lidija Petrushevska-Tozi¹, Aneta Dimitrovska¹,

¹Faculty of Pharmacy, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, R.Macedonia

²Republic Institute of Public Health, Skopje, R.Macedonia

Key words: selenium, therapeutical nutrition, graphite furnace atomic spectrometry, atomic spectrometry with hydride system

An AAS method with graphite furnace and hydride system was developed and validated for determination of selenium in pharmaceutical dosage forms used as therapeutical nutritions. The method was applied for determination of selenium in three therapeutical nutritions after microwave digestion. Acid samples with Pd/Mg nitrate as a modifier were used for graphite furnace and acid samples with sodium borohydride alkaline solution for hydride system. Validation of applied method was carried out by determination of linearity (in concentration range from 15 to 75 µg/l for graphite furnace technique and from 5 to 25 µg/l for hydride system) as well as accuracy, precision, detection and quantification limit. The results obtained have shown that the proposed AAS method with graphite furnace and hydride system for determination of selenium in therapeutical preparations are sensitive, accurate and reproducible.
